

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-46878

(43)公開日 平成6年(1994)2月22日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
A 6 1 K 39/395	T	9284-4C		
C 1 2 N 5/20		9281-4B	C 1 2 N 5/ 00	B
		8931-4B	15/ 00	C

審査請求 未請求 請求項の数 4(全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平4-219664

(22)出願日 平成4年(1992)7月28日

(71)出願人 000003300

東ソー株式会社

山口県新南陽市開成町4560番地

(72)発明者 堀江 隆一

神奈川県川崎市多摩区中野島4-3-31-402

(72)発明者 原 一利

神奈川県平塚市富士見町8-14

(72)発明者 齋藤 貴司

神奈川県中郡大磯町石神台1-5-9

(72)発明者 鈴木 雅代

東京都町田市原町田4-21-12

(72)発明者 繁田 勝美

神奈川県横浜市戸塚区戸塚町4501

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体およびその製造法

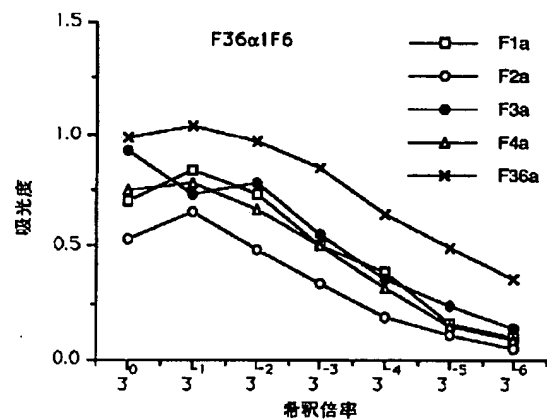
(57)【要約】

【目的】 疾病との関連が考えられる糖脂質誘導体の特異的に認識するモノクローナル抗体を得る。

【構成】 式(F36a)

Galβ1→4GlcNAcβ1→6 (Galβ1→4
GlcNAcβ1→3) GalNAcα1→1Cer
(F36a)

で表わされる糖脂質誘導体を認識するモノクローナル抗体、その製造法、ハイブリドーマ、医薬品組成物。



【特許請求の範囲】

$$\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha 1\rightarrow 1\text{Cer} \quad (\text{F36a})$$

で表わされる糖脂質誘導体を認識するモノクローナル抗体。

【請求項2】請求項1に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】請求項2に記載のハイブリドーマを培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を回収することを特徴とするモノクローナル抗体の製造法。

【請求項4】請求項1に記載のモノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする、医薬品組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は糖脂質誘導体を認識するモノクローナル抗体、その製造方法、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、および医薬品組成物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】細胞表面の糖鎖は、細胞が癌化するとその構造が変化することが知られており、癌関連抗原として注目されている（S. Hakomoriら、J. Natl Cancer Inst. 71, p231, 1983年参照）。従って、細胞が癌化することにより特異的に出現する糖鎖抗原のうち、血清中に分泌されるものを主に認識する抗体は血清診断に用いられ、癌組織を主に認識する抗体は、治療用抗体として期待されている。

【0003】前者の例として、大腸癌に出現するCA19-9抗原を認識する抗体(Koprowski *science*, 212, p53, 1981年参照)、後者の例として、すい臓癌を特異的に認識する抗体Nd2

$$\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 6 (\text{Gal } \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc } \beta 1 \rightarrow 3) \text{GalNAc} \quad (\text{F36a}')$$

を特異的に認識する抗体は報告されておらず、本発明は、その様な糖鎖に反応性を有するモノクローナル抗体を提供することを目的とする。

【0008】

$$\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc} \beta 1 \rightarrow 6 (\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc} \beta 1 \rightarrow 3) \text{GalNAc} \alpha 1 \rightarrow 1 \text{Cer} \quad (\text{F36a})$$

で表わされる糖脂質誘導体を認識するモノクローナル抗体である。また本発明は、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマである。さらに本発明は該ハイブリドーマを培養し、その培養上清よりモノクローナル抗体を回収することを特徴とするモノクローナル抗体の製造

$$\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 6(\text{Gal}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 3)\text{GalNAc}\alpha 1\rightarrow 1\text{Cer} \quad (\text{F36a})$$

で表される糖鎖を認識する。式(F36a)の糖脂質誘導体は、本発明者らによる特願平3-48627に記載の方法に従い、合成することができる。本発明の抗体

【請求項1】式 (F36a)

(Hôら、Cancer Res. 51, p372, 1991年参照) が例示される。

【0004】この様な糖鎖抗原のうち、ムチン型糖蛋白質糖鎖は、糖脂質の糖鎖には見られないユニークな構造を持っていることが知られており、癌関連抗原として有用である。代表的なムチン型糖蛋白質糖鎖としてT抗原 (RahmanらJ. Immunology, 129, p2021, 1982年参照)、Tn抗原 (HirohashiらProc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, p7039, 1985年参照)、sialyl Tn抗原 (NutiらInt. J. Cancer, 29, p539, 1982年参照) が例示される。

【0005】これまではいずれも癌細胞そのもの、または癌細胞から抽出した種々のムチン型糖蛋白質の混合物の粗精製標品をマウス等に免疫しているので、目的とするムチン型糖蛋白質の糖鎖部分に対する抗体を作製するのが非常に困難である。また、作製した抗体が認識する抗原の構造を特定するのが難しい。

【0006】一方、本発明者らはムチン型糖蛋白質の糖鎖部分とセラミドが結合した糖脂質を合成し、これをマウス等に免疫し、ムチン型糖蛋白質の糖鎖部分を認識する抗体を作製した（特開平3-280894）。しかしながら、癌などの疾病と関連のあるムチン型糖蛋白質にはまだ多くの種類があり、それらに対するモノクローナル抗体を用いた研究が必要とされている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】 癌関連ムチン型糖鎖の一種としてその存在が考えられる式 (F36a')

【課題を解決するための手段】以上のような状態に鑑みて本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、本発明に到達した。即ち本発明は、式(F36a)

法である。一方、本発明は該モノクローナル抗体を有効成分として含有することを特徴とする、医薬品組成物である。以下本発明を詳細に説明する。

【0009】本発明のモノクローナル抗体は、式(F36a)

は、式(F 3 6 a)の糖鎖だけでなく、該糖鎖の一部が欠失、付加、あるいは置換したものをさらに認識してもよい。

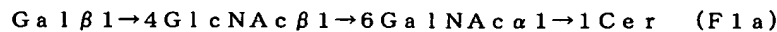
【0010】本発明のモノクローナル抗体は、ケーラー (Kohler G.) らの方法 (Nature 256, 495-497 (1975)) に従い、該糖脂質を動物に投与して免疫し、脾臓細胞を取り出し、これを樹立されたミエローマ細胞と融合させて取得したハイブリドーマにより生産されればよい。

【0011】免疫の際、免疫増強剤 (アジュバント) として不完全アジュバントまたは完全アジュバントのいずれも使用でき、例えば油、乳化剤、結核死菌、サルモネラ死菌およびこれらの混合物などが用いられる。免疫用動物としては、ヒト、ウサギ、マウス、ラットなどほとんどの動物が使用できるが、好ましくはマウス、より好ましくはBALB/c系マウスである。マウスの飼育および、脾臓細胞の採取は常法に従う。

【0012】一方、ミエローマ細胞としては、ヒト、ウサギ、マウス、ラット等ほとんどの動物のミエローマ細胞が使用できるが、好ましくは、BALB/c系マウス由来のSP2/O-Ag8が用いられる。細胞融合の際に用いる融合剤としては、ポリエチレングリコール等が使用できる。

【0013】融合細胞 (ハイブリドーマ) の選択は、免疫処置に用いた糖脂質と反応する培養上清を産生する細胞をスクリーニングする。この際、96穴プレートであれば10プレート以上をスクリーニングするのが好ましい。また、少量の抗体しか産生しないクローンを見逃さないように注意を払う必要がある。次いでハイブリドーマのクローン化は、限界希釈法、メチルセルロース法、軟アガロース法などで行う。

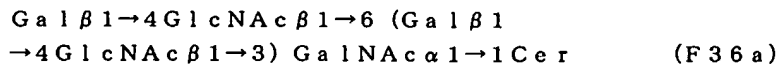
【0014】このようにしてクローン化されたハイブリドーマを培養し、培養上清からモノクローナル抗体を回収すればよい。具体的には、ハイブリドーマを通常の動物細胞の培養と同様に培養し、培地中に生産された抗体を回収すればよい。またマウス等にハイブリドーマを移植し、腹水中にモノクローナル抗体を生産させ、回収してもよい。回収されたモノクローナル抗体の精製には、硫酸沈殿、塩析等の通常の方法を用いればよい。



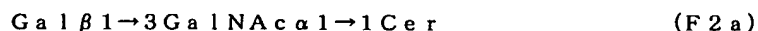
で表される糖脂質は、特開平3-251594記載の方法によって得た。



で表される糖脂質は、特開平3-275694記載の方法によって得た。



で表される糖脂質は、特願平3-48627記載の方法によって得た。



で表される糖脂質は、特開平3-279394記載の方法によって得た。



【0015】この様に樹立される本発明のハイブリドーマとしては、例えばハイブリドーマF36 α 1F6、ハイブリドーマF36 α 2G4、ハイブリドーマF36 α 301、ハイブリドーマF36 α 312が例示できる。また本発明のモノクローナル抗体としては、以上のべたハイブリドーマからそれぞれ得られるF36 α 1F6抗体、F36 α 2G4抗体、F36 α 301抗体、F36 α 312抗体などがあげられる。

【0016】本発明のモノクローナル抗体の性質については、すでに報告されている種々の方法によって調べればよい。このような性質のひとつである、ある種の癌細胞を特異的に認識するかどうかについては、これらの抗体を用いて種々の組織を染色することにより調べることができる。また、ある種の癌患者の血清中に特異的に存在しているかどうかについては、これらの抗体を用いて種々の癌患者の血清を酵素免疫法 (ELISA) 等で測定することにより調べることができる。

【0017】例えば本発明のモノクローナル抗体のそれぞれの性質については、免疫原である式 (F36a) の糖脂質を認識し、さらに、F36 α 301抗体は、Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow 3GalNAc という糖鎖構造に、高い特異性を有していた。

【0018】本発明のモノクローナル抗体は、それを有効成分として含有する医薬品組成物として利用することができる。医薬品組成物としては、診断薬、治療薬などが例示できる。対象疾患は、本発明のモノクローナル抗体の性質を前記方法で解析することにより決めることができる。本発明のモノクローナル抗体は、特に癌の診断、治療への応用が期待される。

【0019】

【実施例】以下に本発明をさらに詳細に説明するために実施例を記載するが、本発明はこれら実施例にのみ限定されるものではない。

【0020】実施例

①ムチン型糖脂質の調製式 (F1a)

【0021】式 (F3a)

【0022】式 (F36a)

【0023】式 (F2a)

【0024】式 (F4a)

→3) GalNAcα1→1Cer

で表される糖脂質は、特願平3-167500記載の方法によって得た。

②モノクローナル抗体作製手順

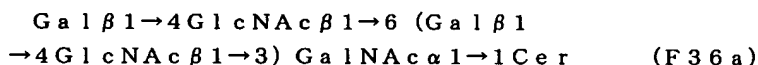
①で得た式(F36a)の糖脂質をSalmonella Minnesotaの死菌に吸着させ、BALB/cマウスの反復腹腔内免疫処置に用いた。免疫処置プロトコルは第0日8μg、第7日16μg、第14日23μg、最終二次免疫第28日23μgであった。3日後、脾臓細胞を回収し、ポリエチレングリコールを融合剤としてマウス骨髓腫SP2/0-Ag8と融合させた。詳細な手順は、ケーラー(Kohler, G.)ほか、ネイチャー(Nature)、256、459-497、1975年に従った。

【0025】①で得た式(F36a)の糖脂質を、スクリーニング時の培養上清の固相酵素免疫検定における抗原として用いた。96穴プレートを10プレートスクリーニングし、限界希釈法によりクローニングして、式(F36a)の糖脂質と反応性の4つのクローン、即ち、ハイブリドーマF36α1F6、F36α2G4、F36α301、F36α312を選択した。これらのクローンはF36α1F6はIgG₃抗体、他の3つはIgM抗体を産生していた。

【0026】これらのハイブリドーマをマウスに移植し、腹水に産生されたモノクローナル抗体を回収し、硫酸沈殿、塩析などにより精製した。

③モノクローナル抗体と種々の糖脂質との反応性の評価
②で得た4種のモノクローナル抗体と種々の糖脂質との反応性を評価するため、固相酵素免疫検定を行った。

【0027】固相酵素免疫検定は96穴プレートに①で作製した5つの糖脂質抗原を固定化し、希釈倍率1~3



の糖脂質を認識し、新規の血清診断薬や体内診断薬、治療薬として期待できる。さらには、個体発生や細胞接着の研究材料として用いることも期待できる。このようなモノクローナル抗体は、式(F36a)の糖脂質を免疫原として得た本発明のハイブリドーマを培養することにより得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例により確認されたF36α1F6抗体の

(F4a)

一⁶の濃度のF36α1F6抗体、F36α2G4抗体、F36α301抗体、F36α312抗体を反応させた後、未反応の抗体を除去し、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(重鎖および軽鎖結合性)および抗マウスIgM(μ鎖結合性)を用いて、ハコモリほか(Hakomori, S. and Kannagi, R.)により「実験免疫学ハンドブック(Handbook of Experimental Immunology)1巻」、ウェアほかブラックエル・サイエンティフィック・パブリッシング社(Blackwell Scientific Pub. Inc. Boston), 1986年に記載された標準法により行った。またカンナギほか(Kannagi, R.)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)258, 8934-8942, 1983年に記載の方法も参照した。

【0028】各モノクローナル抗体の各種糖脂質との反応性の結果を図1~図4に示す。図中、横軸は希釈倍率、縦軸は吸光度を示す。

【0029】図から明らかのように、F36α1F6抗体、F36α2G4抗体、F36α301抗体、F36α312抗体は、免疫原である式(F36a)の糖脂質を認識することが分かった。このうち、F36α301抗体は、

Galβ1→4GlcNAcβ1→3GalNAcという糖鎖構造に、高い特異性を有していることがわかった。

【0030】

【発明の効果】本発明によるモノクローナル抗体は、式(F36a)

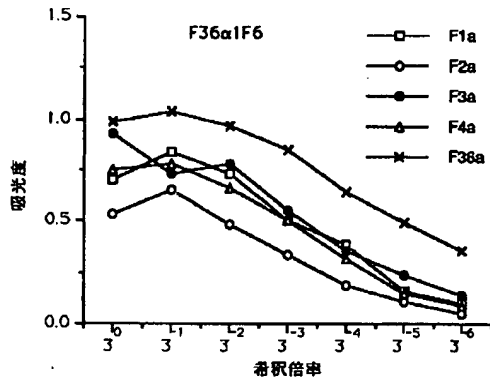
特異性を示す図である。

【図2】実施例により確認されたF36α2G4抗体の特異性を示す図である。

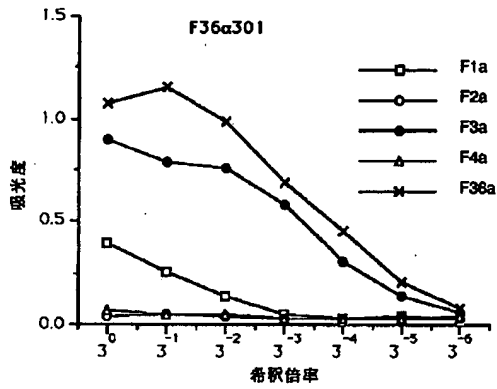
【図3】実施例により確認されたF36α301抗体の特異性を示す図である。

【図4】実施例により確認されたF36α312抗体の特異性を示す図である。

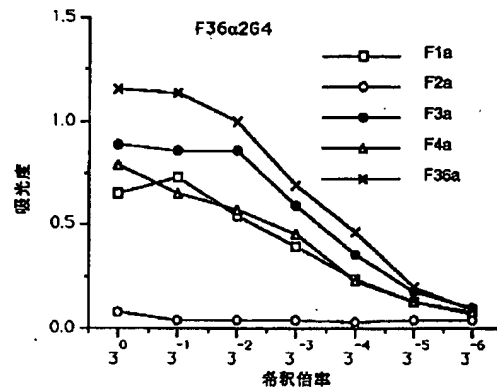
【図1】



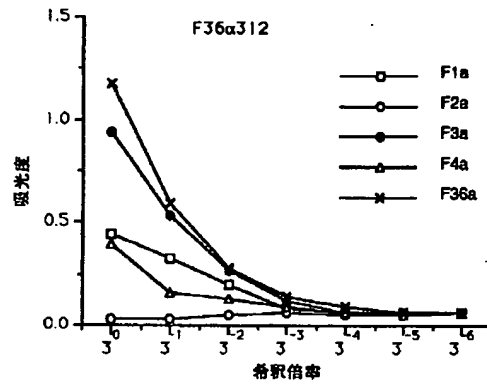
【図3】



【図2】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵

// C 1 2 N 15/06

G 0 1 N 33/574

33/577

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

B 9015-2 J

B 9015-2 J